

A pályázatban elfogadott kísérleti koncepciónk azon alapult, hogy a Prod fehérje az eukromatikus DNS-hez is közvetlenül szekvencia specifikusan kötődik, és ez alapján eukromatikus célszekvenciák azonosíthatók. Mint az utolsó részjelentésből kiderült a munkatervben leírt kísérleteket végrehajtottuk, ám kb. 2004 nyarára világossá vált, hogy azok negatív eredménnyel zárultak. Ez azt jelenti, hogy fehérjénk eukromatikus kötődése nyilvánvalóan elsősorban fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül érvényesül. Ennek megfelelően az utolsó másfél évben alapvetően megváltoztattuk a kísérleti stratégiánkat és két fő irányban indultunk tovább. 1., Mivel a fehérje kozekvens telomerikus lokalizációt mutatott megvizsgáltuk, hogy mi lehet a telomerikus funkciója. 2., Élesztő kettős-hibrid kísérlettel a Prod fehérjéhez kötődő fehérje partnereket azonosítottunk. Mint azt alább bemutatom a telomerikus funkció lényegét sikerült tisztáznunk, amiből két publikáció került benyújtásra. Az élesztő kettős-hibrid kísérlet (y-2-h) eredményei pedig további vizsgálatokhoz nyújtanak alapanyagot.

1., Telomerikus funkció:

A Drosophila telomerei 3 elkülöníthető egységből állnak: 1., A szabad DNS véget védő capping fehérje komplexből, 2., Az emlősök telomerázával analóg módon a kromoszómákat a replikációs rövidüléstől megvédő (azokat folyton hosszabbító) retro-transzpozon repeatekből, 3., Szubtelomerikus heterokromatinból (TAS). 1., A capping komplexben ezidáig mintegy 9 fehérjét azonosítottak, melyek a szabad DNS (kromoszóma) véget szekvenciától függetlenül felismerik és megvédik a degradációtól, amely egyébként a repair mechanizmuson keresztül leblokkolná a sejtciklust és a sejt/egyed pusztulásához vezetne. A capping komplex tehát a legfontosabb telomer komponens. 2., A lineáris kromoszóma végeken a replikáció során az utolsó Okazaki fragment hely hiányában nem tud kialakulni, ami a kromoszóma végek generációnkénti rövidülését okozná. Ezt a problémát a telomeráz enzim oldja meg oly módon, hogy minden replikációs ciklusban meghosszabbítja a kromoszóma végeket. Diptérákban nincs telomeráz, hanem ezzel analóg módon nem-LTR típusú retrotranszpozonok kromoszóma végekre ugrása őrzi meg a kromoszóma végeket a rövidüléstől. Ennek megfelelően a muslica kromoszómák végei hosszú tandem HeT-A, TART és TAHRE nevű retrotranszpozonok ismétlődéseiből állanak, melyek közül a HeT-A a legabundásabb. 3., A retrotranszpozonoktól a kromoszóma közepe felé haladva egy 15-26 kb. hosszú TAS-nak nevezett heterokromatikus szakasz következik, amely repetitív DNS-ből áll, és funkciója kevésbé ismert.

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a 3 szakasz közül melyikhez kötődhet a Prod fehérje. A capping-komplex mutánsaira jellemző fenotípus a diploid kromoszómák telomereinek fúziója. A *prod* mutánsok mitotikus kromoszóma preparátumai nem mutatták ezt a rendellenességet ami azt valószínűsítette, hogy a fehérjénk nem a capping komplex része. Létezik egy olyan deléciót hordozó mutáns törzs ($a y^1$), amely teljes mértékben eltávolítja a TAS régiót az X kromoszómáról. Megfestettük a y^1 törzs, óriáskromoszómáit Prod ellenanyaggal és azt találtuk, hogy az X kromoszómán továbbra is megmaradt a telomerikus lokalizáció. Ebből arra következtettünk, hogy a fehérje nem a TAS régióhoz, hanem a retrotranszpozonokhoz kötődhet a telomereken. A retrotranszpozon ismétlődés hossza egyedenként kissé változik, de létezik egy mutáns törzs (Tel), amely rendkívül hosszú retrotranszpozon ismétlődést tartalmaz a telomerein. Ezt a törzset normál vad típushoz keresztezve a homológ kromoszómák végei jelentős hossz különbséget mutatnak. Ezen heterozigóta telomerek Prod immunofestése során túlnyúló szakasz teljes hosszában intenzív festődést mutatott. Ez végképp megerősítette azt a feltevésünket, hogy a fehérje a mutánsban is a megnövekedett mennyiségű HeT-A retrotranszpozonhoz kötődik, nem pedig a telomer cap struktúrájához.

Ezután többféle módszerrel megvizsgáltuk a Prod fehérjének HeT-A DNS-hez való esetleges kötődését. 1., Szonikált muslica DNS-ből GST-Prod fúziós fehérjével történő GST-pulldown módszerrel, 2., *In vivo* UV-keresztkötés után embriókból izolált kromatinból való Prod-immunoprecipitálással (IP), 3., *In vivo* formaldehid-keresztkötés után embriókból izolált kromatinból való Prod-immunoprecipitálással. Mindhárom módszerrel izolált Prodhoz kötődő DNS frakciót rendezett BAC könyvtárra hibridizáltuk az eredeti munkatervben leírtak szerint. Ezután HeT-A DNS hibridizálásával megvizsgáltuk, hogy a BAC könyvtárból mely BAC klónok tartalmazzanak HeT-A szekvenciákat. Ezután leolvastuk, hogy a HeT-pozitív klónok mutattak-e hibridizációt az előző kísérletekben használt Prod-ot kötő próbákkal. Azt találtuk, hogy a HeT pozitív klónok 80%-át - bár alacsony affinitással, de - szintén felismerte a Prod-szelektált DNS frakció is. Ez arra utalt, hogy a fehérjénk gyengén kötheti a HeT-A DNS-t.

Ahhoz, hogy erre közvetlen bizonyítékot szerezzünk megismételtük az *in vivo* DNS-fehérje keresztkötést, majd a tisztított és szonikált kromatinnal a Prod immunoprecipitálást. A koimmunoprecipitálódó DNS frakciót ezúttal olyan filterre hibridizáltuk, amely a teljes HeT-A transzpozon szekvenciájának ismert restrikciós fragmentjeit tartalmazta. Azt találtuk, hogy a Proddal koprecipitálódó DNS szakaszok a HeT-A promóterének felelnek meg, de TAS szekvenciákhoz való kötődés így sem volt kimutatható. Mivel az UV keresztkötés csupán a DNS-hez közvetlenül kapcsolódó fehérjét köti a DNS-el ez azt jelenti, hogy a Prod fehérje közvetlenül kötődik a HeT-A promóteréhez. Ezzel szemben az *in vitro* GST-pulldown kísérletek során csupán igen gyenge interakciót sikerült kimutatnunk a HeT-A promóterrel. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy *in vivo* a kötést egyéb fehérjék stabilizálhatják.

A telomerek hosszának szabályozása a retrotranszpozonok transzkripció szabályozásával képzelhető el, és a promóterhez kötődő Prod fehérje transzkripció szabályozó lehet. Ennek igazolására kvantitatív real-time PCR-rel megvizsgáltuk, hogy a heterozigóta *prod* mutáns törzsben - melyet több mint 10 éve tartunk fenn - az idők során megváltozott-e a HeT-A ismétlődések száma, illetve a HeT-A gén transzkripció szintje. Azt találtuk, hogy a retrotranszpozonok száma a vad típusával megegyező maradt, de azok transzkripció szintje 6,5-ször nagyobb mint a vad típusé. Ez arra utal, hogy a Prod fehérje a HeT-A promóteren valóban transzkripció represszorként működik, azonban a megemelkedett transzkripció önmagában nem elegendő a transzpozíciók gyakoriságának megemelkedéséhez. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a mutásokban intakt marad a cap struktúra, amely megakadályozza a szabad DNS végekre történő retrotranszpozíciót.

Ez az eredmény azért jelentős, mivel a Prod-on kívül idáig csupán két retrotranszpozonokhoz kötődő fehérjét azonosítottak, de azoknak sem tudják a szerepét. Nem ismert a telomerikus HeT-A repeatek kromatin szerkezete sem, valamint az a szigorú szabályozó mechanizmus, amely a kromoszóma végekre történő ugrásuk gyakoriságát megszabja. További kutatási irányt jelent a kötésben résztvevő szekvencia azonosítása *in vivo* footprint-tel, valamint a Prod komplex egyéb fehérje tagjainak azonosítása, melyhez a y-2-h kísérlet eredményei nyújthatnak segítséget.

2., Élesztő kettős-hibrid kísérlet.

Ezidáig 6 kölcsönható fehérjét azonosítottunk: 1., Prod. 2., Pliohomeoticlike (Phl), 3., CG9797 egy nem jellemzett cink-finger protein. 4., CG8801 egy nem jellemzett GTP-kötő protein, 5., Cystatin-like, egy cystein proteáz gátló fehérje, 6., CG4847 egy cathepsinK protein cystein-típusú peptidáz aktivitással.

Az első ezek közül különösen fontos, mivel korábbi munkáinkban csak közvetett bizonyítékunk volt arra, hogy a Prod multimerként kötődik a DNS-hez, és ez most közvetlen igazolást nyert. A Pliohomeoticlike egy Polycomb csoportba tartozó DNS-kötő fehérje, amely szupresszor komplexekből ismert. Az ismeretlen CG9797 cink-finger fehérje szintén kromatin alkotórész lehet. Ez a két fehérje partner azt mutatja, hogy a Prod

egyéb DNS-kötő fehérjékkel kölcsönhatva kötődik a kromatinhoz, és a kötőhelyek kombinációja a DNS-en alapvetően megszabhatja a lokalizációt. Az utolsó 4 interakciónak egyelőre nem tulajdonítunk jelentőséget.

Jelenleg további 100 interakciót mutató fehérje génje vár szekvenálásra. Az ígéretesnek ígérkező fehérje interakciókat immunoprecipitálással ellenőrizzük, majd a kölcsönhatások genetikai bizonyításával próbálkozunk. Mivel a *phl* mutánsok beszerezhetők voltak, már elkezdtük a *phl*-el való genetikai kölcsönhatás vizsgálatát, valamint a mutánsok kromoszóma festését.